

AKTIVITAS ANTIINFLAMASI SECARA IN-VITRO EKSTRAK TERIPANG BUTOH KELING (*Holothuria leucospilota* Brandt) DARI PULAU LEMUKUTAN

Edi Wiranto^{1*}, Muhamad Agus Wibowo¹, Puji Ardiningsih¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura

Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Pontianak

*email: wirantoedi20@gmail.com

ABSTRAK

Teripang butoh keling (*Holothuria leucospilota* Brandt) merupakan biota laut yang banyak ditemukan di perairan Indonesia, salah satunya di perairan pulau Lemukutan. Namun, oleh masyarakat pulau Lemukutan *Holothuria leucospilota* Brandt belum dimanfaatkan secara optimal baik sebagai bahan pangan berkhasiat medis maupun sebagai komoditas yang bernilai ekonomis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan metabolit sekunder dari *H. leucospilota* dan aktivitas antiinflamasi ekstrak metanol *H. leucospilota* dengan menggunakan metode stabilisasi membran sel darah merah. Inhibisi hemolisis akibat induksi larutan hipotonis digunakan sebagai ukuran aktivitas antiinflamasi. Aktivitas antiinflamasi ekstrak metanol *H. leucospilota* dibandingkan dengan standar aspirin 100 µg/mL. Analisis fitokimia ekstrak metanol *H. leucospilota* menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid, steroid dan triterpenoid yang diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi. Hasil uji aktivitas antiinflamasi menunjukkan bahwa ekstrak metanol *H. leucospilota* pada konsentrasi 10, 100, 500 dan 1000 µg/mL masing-masing sebesar 31,27; 57,19; 59,18 dan 61,23%, dimana standar aspirin mempunyai aktivitas sebesar 67,59%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol *H. leucospilota* Brandt berpotensi sebagai agen antiinflamasi.

Kata Kunci: *antiinflamasi, Holothuria leucospilota* Brandt, sel darah merah

PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan suatu respon protektif tubuh yang berperan dalam melawan agen penyebab kerusakan sel pada daerah lokal yang mengalami cedera, seperti karena terinfeksi atau luka bakar (Tanu, 2002). Pada daerah ini akan terjadi rangkaian reaksi untuk memusnahkan agen yang membahayakan jaringan atau mencegah agen menyebar lebih luas. Reaksi-reaksi ini kemudian juga menyebabkan jaringan yang cedera diperbaiki atau diganti dengan jaringan baru, proses ini dikenal dengan peradangan. Saat terjadi inflamasi, beberapa mediator kimia dilepaskan oleh sel seperti histamin, 5-hidroksitriptamin atau serotonin, leukotrien, dan prostaglandin. Tanda-tanda dari proses inflamasi antara lain adalah *rubor* (kemerahan), *kalor* (panas), *tumor* (pembengkakan), *dolor* (nyeri), dan *function laesa* (perubahan fungsi) (Tanu, 2002).

Teripang merupakan jenis biota laut yang tersebar di perairan Indonesia, salah satunya teripang butoh keling (*Holothuria*

leucospilota Brandt). Jenis teripang ini juga banyak ditemukan di perairan pulau Lemukutan, Kabupaten Bengkayang, Kalimantan Barat. Menurut Albuntana (2011), *H. leucospilota* memiliki bioaktivitas yang tinggi dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut sebagai bahan baku obat. Althunibat *et al.*, (2009) melaporkan bahwa *H. leucospilota* mengandung jumlah fenolik yang tinggi, hal yang sama juga dilaporkan oleh Sukmiwati (2012) bahwa *H. leucospilota* mengandung senyawa fenolik dan terpenoid yang berpotensi sebagai antioksidan. Kurniawan *et al.*, (2012) dalam penelitiannya mengatakan bahwa *H. leucospilota* mengandung senyawa steroid. Selain itu, menurut Firdaus (2015) *H. leucospilota* mengandung senyawa triterpenoid dan flavonoid. Middleton (2000) melaporkan bahwa golongan senyawa flavonoid memiliki kemampuan dalam menstabilkan membran. Selain itu, menurut Ko *et al.*, (2007) dalam penelitiannya juga melaporkan bahwa golongan senyawa triterpenoid memiliki kemampuan dalam menstabilkan membran. Di negara Cina,

dilaporkan bahwa secara medis tubuh dan kulit teripang jenis *Stichopus japonicus* berkhasiat sebagai anti-inflamasi (Martoyo et al., 2006). Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui potensi *Holothuria leucospilota* Brandt dari perairan pulau Lemukutan sebagai obat antiinflamasi dengan menggunakan metode stabilisasi membran sel darah merah.

METODE PENELITIAN

a. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, batang pengaduk, beaker, blender, botol vial, *cool box*, *hot plate*, labu ukur, *magnetic stirrer*, mikropipet, neraca analitik, oven, pipet tetes, pipet volume, *rotary evaporator*, *sentrifuse*, spatula dan *Spektrofotometer UV-Vis*.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah teripang *H. leucospilota* Brandt, akuades, aspirin (100 µg/mL), asam klorida (HCl 2 N), buffer natrium posfat 0,15 M (pH 7,4), larutan Alsever (dekstrosa 2,45 gram; sodium citrat 2,20 gram; asam sitrat 0,73 gram dilarutkan dalam 100 mL *water for injection*), darah (10% v/v suspensi sel darah merah), isotonik saline (0,85% w/v NaCl), hipotonik saline (0,25% w/v NaCl), magnesium, metanol p.a, MgSO₄ 5%, pereaksi FeCl₃ 1%, pereaksi Mayer, pereaksi Liebermann-Burchard dan pereaksi Wagner.

b. Metode

Penelitian yang dilakukan dibagi menjadi 3 tahap. Penelitian tahap I, mengekstrak metabolit sekunder *H. leucospilota*. Tahapan dari proses ekstraksi yaitu merendam, mencuci dan membersihkan isi perut, memotong-motong daging *H. leucospilota* kemudian dikering anginkan, dimaserasi dengan pelarut metanol selama 24 jam dan dipisahkan antara filtrat dan residunya kemudian residu direndam kembali dengan metanol dan dilakukan berulang kali hingga warna residu menjadi pucat. Filtrat kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 30-40°C, kemudian ditentukan kandungan fitokimia menurut Harborne (1987).

Tahap II, yaitu preparasi suspensi (10% v/v) sel darah merah tikus. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi yang telah berisi larutan alsever dengan perbandingan yang sama, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit pada suhu ruang. Supernatan yang terbentuk dipisahkan dengan hati-hati dari sel darah merah menggunakan pipet tetes steril. Endapan sel-sel darah dicuci dengan larutan isosaline dan disentrifugasi kembali. Proses pencucian dan sentrifugasi dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali sampai supernatan jernih. Volume sel darah merah diukur dan diresuspensi dengan larutan isosaline sehingga diperoleh konsentrasi suspensi sel darah merah 10% v/v (Manivannana dan Sukumar, 2007).

Tahap III, yaitu dilakukan uji aktivitas antiinflamasi secara in-vitro dengan menggunakan metode stabilisasi membran sel darah merah dan dibandingkan dengan larutan standar (aspirin 100 µg/mL). Campuran uji terdiri dari 2 mL hipotonik saline; 1,0 mL 0,15 M buffer natrium posfat (pH 7,4); 0,5 mL (10% v/v) suspensi sel darah merah dan 1,0 mL sampel uji dan larutan standar. Campuran uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, dan kemudian larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 560 nm. Persentase inhibisi hemolisis dihitung dengan menggunakan rumus (Leelaprakash and Dass, 2011):

$$\% \text{ inhibisi hemolisis} = 100\% \times \left(\frac{A_1 - A_2}{A_1} \right)$$

Dimana: A1 = Absorbansi larutan kontrol uji

A2 = Absorbansi larutan uji/larutan standar uji

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Teripang *H. leucospilota* berwarna cokelat kehitaman, memiliki tentakel menyerupai kembang kol, terdapat bintil pada seluruh bagian tubuh, berlendir dan memiliki getah putih dengan rata-rata memiliki panjang 25-35 cm dan diperoleh berat bersihnya sebanyak 10 kg.

Selanjutnya dilakukan maserasi dengan pelarut metanol untuk menarik metabolit yang terdapat pada ekstrak. Metanol memiliki sifat yang baik dalam

melarutkan metabolit dari sampel, yaitu dapat memecah dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan didalam dan diluar sel, sehingga metabolit yang terdapat pada sitoplasma akan larut dalam pelarut metanol dan akan terekstraksi sempurna (Darwis, 2000). Maserasi dilakukan berulang-ulang hingga warna dari sampel pucat, kemudian filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 30-40°C. Ekstrak kasar *H. leucospilota* diperoleh sebanyak 565,86 g dengan persentase rendemen sebesar 5,66%.

Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia yang dilakukan yaitu uji steroid, triterpenoid, alkaloid, saponin, polifenol dan flavonoid menurut Harborne (1987). Fitokimia merupakan bagian dari ilmu pengetahuan alam yang bidang perhatiannya adalah aneka ragam senyawa organik yang dibentuk baik oleh tumbuhan maupun oleh hewan meliputi struktur kimianya, biosistesisnya, perubahan serta metabolismenya, penyebaran secara ilmiah dan fungsi biologisnya (Rustaman *et al.*, 2006). Metabolit yang terdapat pada *H. leucospita* Brandt ditunjukkan pada Tabel 2. Ekstrak *H. leucospilota* positif mengandung triterpenoid yang ditandai dengan terbentuknya warna merah keunguan saat ditambahkan dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Senyawa triterpenoid yang memiliki struktur siklik berupa alkohol yang menyebabkan senyawa ini cenderung bersifat semipolar (Titis *et al.*, 2013).

Ekstrak *H. leucospilota* juga positif mengandung steroid yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau saat ditambahkan dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Steroid bersifat non-polar sehingga dapat larut dalam pelarut-pelarut non-polar dan secara umum tidak larut dalam air atau pelarut polar lainnya. Meskipun demikian, dengan meningkatnya gugus hidroksil (OH⁻) atau gugus fungsional polar lainnya pada kerangka steroid, membuat kelarutan steroid dalam pelarut polar menjadi meningkat (Sarker dan Nahar, 2009).

Ekstrak *H. leucospilota* positif mengandung saponin. Menurut Zhang *et al.*, (2006) saponin merupakan senyawa yang dominan dihasilkan oleh teripang. Saponin memiliki kerangka glikosida kompleks yang apabila dihidrolisis akan menghasilkan suatu senyawa triterpenoid

dan glikosida (gula). Menurut Wu *et al.* (2007), saponin mudah larut dalam air sehingga metabolit tersebut terkonsentrasi pada pelarut yang bersifat polar, hal ini dikarenakan glikosa (gula) sangat banyak mengandung gugus OH⁻, sehingga sangat baik larut dalam air dan pelarut polar lainnya.

Ekstrak *H. leucoapilota* juga positif mengandung flavonoid. Menurut Markham (1988), flavonoid memiliki ikatan dengan gugus gula yang menyebabkan flavonoid bersifat polar, hal ini dibuktikan dengan perubahan warna pada flavonoid dengan pereaksi Mg-HCl.

Tabel 1. Analisis Fitokimia Ekstrak *H.leucospilota*

Uji	EK
Steroid	++
Triterpenoid	+++
Alkaloid	-
Saponin	+
Polifenol	-
Flavonoid	+++

Keterangan: EK : ekstrak kasar
 - : hasil negatif
 + : hasil positif lemah
 ++ : hasil positif kuat
 +++ : hasil positif sangat kuat

Uji Aktivitas Antiinflamasi

Stabilisasi dari membran sel darah merah digunakan sebagai metode untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi secara in-vitro. Hal ini dikarenakan membran sel darah merah mirip dengan membran lisosom (Shenoy *et al.*, 2010; Leelaprakash and Dass, 2011) yang dapat mempengaruhi proses inflamasi sehingga stabilitas lisosom penting dalam membatasi respon inflamasi, yaitu dengan cara mencegah pelepasan enzim dari dalam lisosom selama proses inflamasi berlangsung (Lutfiana, 2013). Dengan demikian, stabilisasi membran sel darah merah yang diinduksi dengan larutan hipotonik dapat digunakan sebagai ukuran untuk mengindikasikan stabilisasi dari membran lisosom (Manivannana and Sukumar, 2007).

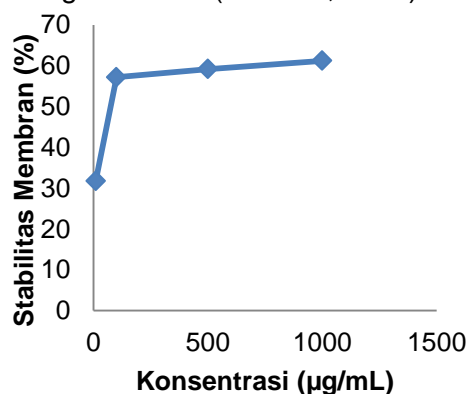
Stabilitas membran sel darah merah dari ekstrak *H. leucospilota* dan aspirin 100 µg/mL ditunjukkan pada (Tabel 2). Sampel uji yang memiliki aktivitas antiinflamasi dilihat dari penurunan absorbansi hemoglobin yang terdeteksi pada campuran larutan uji, yaitu semakin kecilnya serapan

yang terdeteksi pada campuran larutan uji berarti membran sel darah merah semakin stabil dan sedikit mengalami lisis (Lutfiana, 2013). Setelah pengukuran dan diperoleh data absorbansi kemudian dihitung persen inhibisinya. Persen inhibisi adalah kemampuan suatu sampel untuk menstabilisasi sel darah merah yang didapat dari perbandingan serapan antara serapan (absorbansi kontrol dikurangi absorbansi larutan uji) dengan absorbansi kontrol.

Tabel 2. Persen Inhibisi *H. leucospilota* dan Standar Aspirin

Ekstrak	Konsentrasi (µg/mL)	Inhibisi Hemolisis (%)
<i>H. leucospilota</i>	10	31,27
	100	57,19
	500	59,18
	1000	61,23
Aspirin	100	67,59

Ekstrak *H. leucospilota* memberikan stabilitas membran sel darah merah pada setiap variasi konsentrasi (Gambar 2), yaitu semakin besar konsentrasi sampel maka semakin kecil absorbansi, sehingga stabilitas membran semakin besar. Semakin kecilnya serapan yang terdeteksi pada campuran larutan uji, berarti membran sel darah merah semakin stabil dan sedikit mengalami lisis (Lutfiana, 2013).



Gambar 2. Kurva stabilisasi membran eritrosit dari ekstrak *H. leucoapilota*

Senyawa yang memiliki kemampuan untuk menstabilkan membran dikenal karena dapat mengganggu proses awal dari fase inflamasi. Analisis kimia menunjukkan bahwa ekstrak *H. leucospilota* Brandt mengandung senyawa saponin,

triterpenoid, steroid dan flavonoid. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa ada hubungan antara kemampuan senyawa flavonoid dalam menstabilkan membran dan sebagai penghambat proses enzimatik selama inflamasi berlangsung (Middleton *et al.*, 2000). Hasil penelitian Muralidhar *et al* (2010) menunjukkan bahwa flavonoid yang diisolasi dari kulit batang *Butea monosperma*, yaitu Genistein (4',5,7-trihydroxy isoflavone) dan Prunetine (4',5-dihydroxy-7-methoxy isoflavone) memiliki kemampuan menghambat kerja enzim siklooksigenase dan lipooksigenase dalam mengkonversi asam arakidonat menjadi prostaglandin dan leukotrien yang merupakan mediator inflamasi. Selain itu, Manivannana dan Sukumar (2007) juga melaporkan bahwa senyawa flavonoid yang diisolasi dari *Luecas aspera* bertanggung jawab terhadap stabilitas membran sel darah merah tikus albino dari hemolisis yang diinduksi larutan hipotonik.

Selain flavonoid, senyawa yang juga diduga memiliki kemampuan menstabilkan membran adalah triterpenoid. Senyawa triterpenoid glikosida telah diisolasi dari *H. leucospilota* Brandt (Kitagawa *et al.*, (1978) didalam Radhika *et al.*, 2002), dimana beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa triterpenoid berhubungan dengan stabilitas membran. Hasil penelitian Wu *et al* (2011) menunjukkan bahwa, senyawa triterpenoid dari *Ligustrum* memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim siklooksigenase dalam mengkonversi asam arakhidonat menjadi prostaglandin sebagai mediator inflamasi. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Cippada *et al* (2011) bahwa senyawa flavonoid dan triterpenoid dari ekstrak *Cintella asiatica* bertanggung jawab terhadap aktivitas antiinflamasi dalam menstabilkan membran sel darah merah.

KESIMPULAN

Metabolit sekunder yang diduga memiliki kemampuan dalam menstabilkan membran adalah steroid, triterpenoid dan flavonoid. Ekstrak metanol *H. leucospilota* memiliki aktivitas antiinflamasi pada berbagai variasi konsentrasi (10, 100, 500 dan 1000 µg/mL), yaitu masing-masing sebesar 31,27; 57,19; 59,18 dan 61,23%. Ekstrak *H. leucospilota* Brandt berpotensi sebagai obat antiinflamasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Albuntana, A., Yasman dan Wardhana, W., 2011, *Uji Toksisitas Empat Jenis Teripang Suku Holothuriidae dari Pulau Penjaliran Timur, Kepulauan Seribu, Jakarta Menggunakan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*, Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis, 3(1):65-72.
- Althunibat, O.Y., Ridzwan., Taher, M., Daud, J.M., Ikeda, M.A., and Zali, B.I., 2009, *In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Three Malaysian Sea Cucumber Species*, European Journal of Scientific Research, 37(3):376-387.
- Aras, T.R., 2013, Uji Toksisitas Ekstrak Teripang *Holothuria scabra* Terhadap *Artemia salina*, Universitas Hasanudin.
- Darwis D., 2000, Teknik Dasar Laboratorium Dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam Hayati, Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati, FMIPA Universitas Andalas, Padang.
- Firdaus, R., Ardiningsih, P., dan Arreneuz, S., 2015, Aktivitas Antijamur Ekstrak Teripang Butoh Keling (*Holothuria leucospilota*) dari Pulau Lemukutan Terhadap *Candida albicans*. Universitas Tanjungpura.
- Ko, H.H., Hung, C.F., Wang, J.P., and Lin, C.N., 2007, *Antiinflammatory Triterpenoids and Steroids from Ganoderma lucidum and Ganoderma tsugae*, ELSEVIER, pp: 1-6.
- Kitagawa, I., Nishino, T., Matsuno, T., Akutsu H and Kyogoku, Y., 1978, Tetrahedron Lett, pp:985.
- Kurniawan, A dan Kurniawan, A., 2012, *Studi Potensi Teripang di Perairan Bangka Sebagai Sumber Steroid Untuk Sex Reversal Ikan Nila*, AQUASAINS Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberdaya Perairan, Hal: 57-60.
- Leelaprakash, G., and Dass, S.M., 2011, *In-vitro Antiinflammatory Activity of Methanol Extract of Enicostemma axillare*, International Journal of Drug Development and Research, 3(3): 189-196.
- Lutfiana, 2013, Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dengan Metode Stabilisasi Membran Sel Darah Merah Secara In Vitro, Universitas Islam Negeri, Jakarta.
- Manivannana, R., and Sukumar, D., 2007, *The RBC Membrane Stabilisation in an In Vitro Method by the Drug Isolated from Lucas aspera*, International Journal of Applied Science and Engeneering, 5(2): 133-138.
- Markham, K.R., 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid', ITB, Bandung.
- Middleton, E.JR., Kandaswami, C., and Theoharides, T. C., 2000, *The Effect of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer*, The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 52(4): 673-751.
- Muralidhar, A., Babu, K.S., Sankar, T.R., Reddanna, P., Reddy, G.V., and Latha, J., 2010, *Anti Inflammatory Activity of Flavonoid Fraction Isolated from the Stem Bark of Butea monosperma Lam: a Mechanism Based Study*, International Journal of Phytopharmacology, 1(2): 124-132.
- Radhika, P., Anjaneyulu, V., Rao, P.V.S., Makareiva, T.N and Kalinovosky, A.I., 2002, *Chemical examination of the Echinoderms of Indian Ocean: The triterpene glycosides of the sea cucumber: Holothuria nobilis, Bohadschia aff. Tenuissima and Actinopyga mauritana from Lakshadweep, Andaman and Nicobar Islands*, Indian Journal of Chemistry, (41B): 1276-1282.
- Rustaman., Abdurahman, H.M dan Anshori, J.A., 2006, "Skrining Fitokimia Tumbuhan di Kawasan Gunung Kuda Kabupaten Bandung Sebagai Penelaahan Keanekaragaman Hayati", Laporan Penelitian, Universitas Padjadjaran.
- Sarker, S.D., dan Nahar, L., 2009, Kimia Untuk Mahasiswa Farmasi: Bahan Kimia Organik, Alam dan Umum, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Shenoy, S.K.S., Prabhu, K., Maradi, R., Bairy, K.L and Shanbhag, T., 2010, *Evaluation of Anti-inflammatory*

- Activity of Tephrosia purpurea in Rats*, Asian Pasific Journal of Tropical Medicine, 3(3): 193-195.
- Sukmiwati, M., 2012, Uji Aktivitas Antioksidan pada 16 Spesies Teripang yang Ditemukan pada Perairan Natuna Kepulauan Riau, Perpustakaan Universitas Riau, Hal: 222-228.
- Tanu, I., Syarif, A., Estuningtyas, A. Setiawati, A., Muchtar, H.A., dan Arif, A., 2002, Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Titis, M. B.; Fachriyah, E.; dan Kusriani, D., 2013, *Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Senyawa Alkaloid Daun Bahinong (Anredera cordifolia (Tenore) Steenis)*, Chem, 1:196-201.
- Wu, J., Tang, J., Wu, H.M., and Zhou, Z.R., 2007, *Hillasides A and B, Two New Cytotoxic Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber Holothuria hilla lesson*, Asian Natural Products Research, 9: 609-615.
- Zhang, Y.S., Yi, H.Y., and Tang, H.F., 2006, *Cytotoxic Sulfated Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber Pseudocolochirus violaceus*, Chemistry and Biodiversity, 3: 807-817.